

## JP61238793

Publication Title:

NOVEL PHOSPHOLIPID DERIVATIVE

Abstract:

NEW MATERIAL: A compound expressed by formula I (R1 and R2 represent long-chain fatty acid residue; Base represents cytosin-1-yl or adenin-9-yl) or a salt thereof.

USE: A raw material for medicines such as a substrate used for phospholipase activity measurement or an antitumor agent, obtainable in good yield by one process.

PREPARATION: For example, a compound (example; dipalmitoylphosphatidylcholine) expressed by formula II (R3 is choline residue) is reacted with cytidine or adenosine by using a phospholipase D [preferably a phospholipase D-P originating from *Streptomyces* sp. AA586 (FERM-P No.6100)], preferably in a mixed solvent such as 100mM acetic acid buffer solution (5.6pH)-chloroform in the presence of a metal ion, for example such as calcium chloride at 20-60 deg.C for 0.5-5hr.

-----  
Data supplied from the esp@cenet database - <http://ep.espacenet.com>

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-238793

⑤ Int. Cl.<sup>4</sup>  
C 07 F 9/65

識別記号 庁内整理番号  
F-7055-4H  
G-7055-4H

④ 公開 昭和61年(1986)10月24日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑭ 発明の名称 新規リン脂質誘導体

⑮ 特 願 昭60-81786

⑯ 出 願 昭60(1985)4月17日

⑰ 発 明 者	周 東 智	静岡県田方郡大仁町三福632-1
⑰ 発 明 者	伊 東 裕 通	三島市藤代町379-15
⑰ 発 明 者	福 川 清 史	三島市谷田桜ヶ丘1477-12
⑰ 発 明 者	榊 原 秀 夫	三島市中273-12
⑰ 出 願 人	東洋醸造株式会社	静岡県田方郡大仁町三福632番地の1

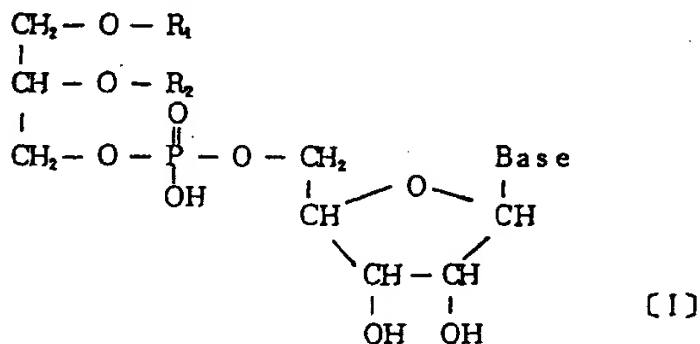
明 細 書

1. 発 明 の 名 称

新規リン脂質誘導体

2. 特 許 請 求 の 範 囲

(1) 下 記 一 般 式 [I]



(ただし式中、 $\text{R}_1$ および $\text{R}_2$ は長鎖脂肪酸残基、Baseはシトシン-1-イル基またはアデニン-9-イル基を示す)で表わされるリン脂質誘導体またはその塩。

(2) 一般式[I]において、 $\text{R}_1$ および $\text{R}_2$ がパルミトイル基、Baseがシトシン-1-イル基である特許請求の範囲第1項記載のリン脂質誘導体また

はその塩。

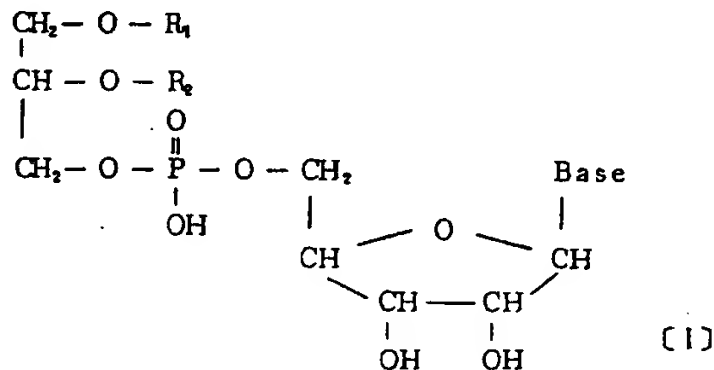
(3) 一般式[I]において、 $\text{R}_1$ および $\text{R}_2$ がラジール基、Baseがシトシン-1-イル基である特許請求の範囲第1項記載のリン脂質誘導体またはその塩。

(4) 一般式[I]において、 $\text{R}_1$ および $\text{R}_2$ がラジール基、Baseがアデニン-9-イル基である特許請求の範囲第1項記載のリン脂質誘導体またはその塩。

3. 発 明 の 詳 細 な 説 明

産業上の利用分野

本発明は、下記一般式[I]



(ただし式中、 $R_1$ および $R_2$ は長鎖脂肪酸残基、Baseはシトシン-1-イル基またはアデニン-9-イル基を示す)で表わされるリン脂質誘導体またはその塩に関する。

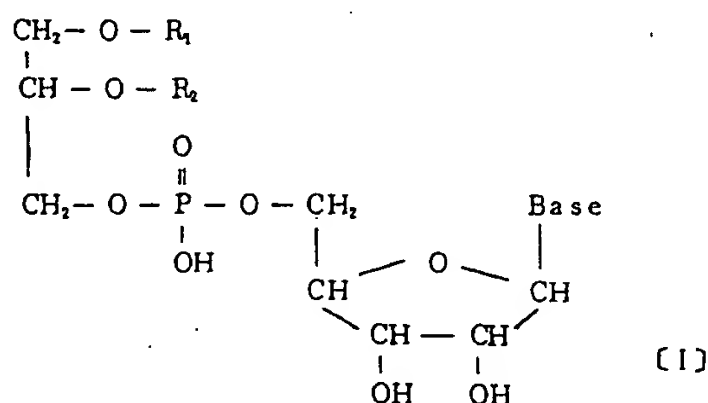
#### 従来の技術

近年リン脂質誘導体は、界面活性作用や抗腫瘍作用を期待して種々の誘導体が知られており、さらに種々の医薬原料やホスホリパーゼ活性測定用基質として利用されている。例えばヌクレオシドのリン脂質誘導体は、ヌクレオシド系抗腫瘍剤における加リン酸分解、脱アミノ化等の作用を受けて急速に不活性な物質に分解されやすいこと、腫瘍細胞がこれら抗腫瘍剤に対して抵抗性を示すようになること、急速に分裂しつつある正常細胞に対しても毒性を表わすなどの欠点を改善する目的にて行なわれていた。このようなことから抗腫瘍作用を有するヌクレオシドのリン脂質誘導体として、シトシンアラビノシド(Ara-C)を含むリン脂質誘導体が合成され、ある程度の効果が認められていた[Biochimica et Biophysica Acta,

多段階の合成工程を必要とし、かつ反応条件も設定し難く、合成は実質上困難であつた。

本発明者らは、このような欠点を有する合成法を改善し、新たにリン脂質誘導体を合成した。即ち本発明はグリセロリン脂質とシチジンまたはアデノシンとを、一級水酸基に対して特異的にリン脂質転移反応を触媒するホスホリパーゼD-Pの存在下にて反応させることにより、シチジン、アデノシンの5'位一級水酸にホスファチジル基が容易に転移して一般式〔I〕で表わされる新規リン脂質誘導体を得たものである。

本発明は、上記の知見に基づいて完成されたもので、下記一般式〔I〕



619 (1980) 619 - 631, J. Med. Chem., 1982, 25, 1322 - 1329]。

#### 発明が解決しようとする問題点

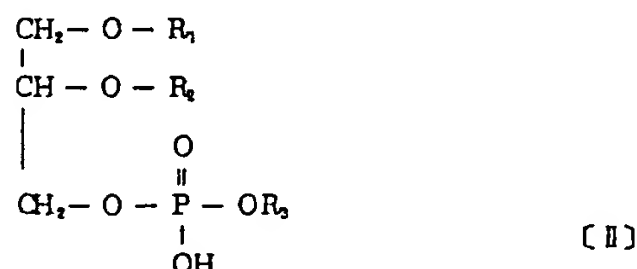
上述したようなヌクレオシドのリン脂質誘導体は化学的合成法で合成されているため、その合成には多段階反応工程を必要とし、従つて収率も低く、しかも工程もはん雑であつた。またそのためにヌクレオシドのリン脂質誘導体のヌクレオシド成分としてはシトシンアラビノシドの例しかなく、その他の異なるヌクレオシドのリン脂質誘導体は合成されず、知られていないものであつた。従つてまたその抗腫瘍剤としての効果も、終局的にはシトシンアラビノシドとしての効果しかなく、これに伴う毒性等の欠点も改善されたものではなかつた。

#### 問題点を解決するための手段

このような欠点を解決するための一手段としては、シトシンアラビノシド以外のヌクレオシドを使用すればよいのであるが、それらのヌクレオシドおよびリン脂質をもつて化学的に合成するには

(ただし式中、 $R_1$ ,  $R_2$ およびBaseは前記と同じ基を示す)で表わされるリン脂質誘導体またはその塩である。

まず、本発明の一般式〔I〕で表わされるリン脂質誘導体(以下単に、リン脂質誘導体〔I〕と略す)を得るに用いられるグリセロリン脂質としては、例えば下記一般式〔II〕で表わされるホスファチジルコリン系グリセロリン脂質が挙げられる。



(ただし式中、 $R_1$ および $R_2$ は前記と同じ基を示し、 $R_3$ はコリン残基を示す)

さらに一般式〔II〕で表わされるホスファチジルコリン系グリセロリン脂質において、基 $R_1$ ,  $R_2$ は同一または異なる長鎖脂肪酸残基を示すものであるが、例えば炭素数16~20の長鎖脂肪酸残基であり、詳細には例えば、パルミトイル、ステア

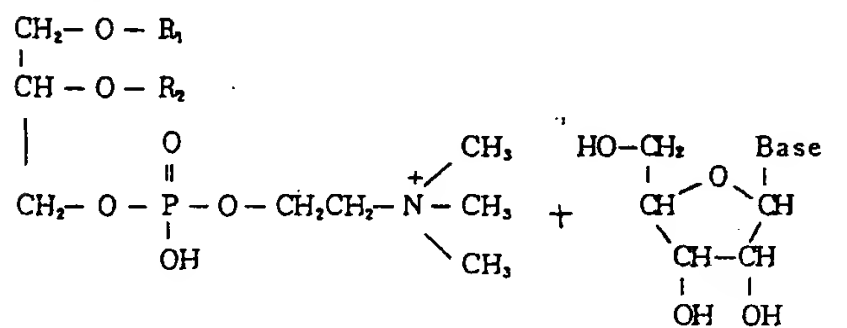
ロイル、エイコサノイルなどの炭素数 16 ~ 20 の長鎖飽和脂肪酸残基、パルミトオレオイル、オレオイル、リノレオイル、リノレノイル、アラキドニルなどの 1 ~ 4 つの不飽和結合を有する炭素数 16 ~ 20 の長鎖不飽和脂肪酸残基が挙げられ、具体的には  $R_1$  および  $R_2$  がともにパルミトイル基で示されるジパルミトイルホスファチジルコリン、 $R_1$  および  $R_2$  がともにリノレオイル基で示されるジリノレオイルホスファチジルコリンなどの飽和または不飽和長鎖脂肪酸残基を有するホスファチジルコリンでもよく、さらに  $R_1$  および  $R_2$  が炭素数 16 ~ 20 の長鎖脂肪酸の混合体であるラジール (Radyl) 基で示される天然のホスファチジルコリンでもよい。またこれらの  $R_1$  および  $R_2$  の基を有するホスファチジルコリンは、適宜炭素数 16 ~ 20 の脂肪酸を用いて合成してもよく、市販のものを用いてもよい。

また本発明におけるシチジン、アデノシンは、市販のものを用いればよい。

さらにリン脂質誘導体〔I〕を得るに当つて、前

としては特開昭 58 - 152481 号公報に記載の酵素活性を阻害しないものを用いてもよく、また反応温度は通常 30 ~ 50 °C で、反応時間は 30 分 ~ 5 時間で充分である。このようにして得られたリン脂質誘導体〔1〕は、分液法およびシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより簡便に精製することができる。

以上述べたような本発明のリン脂質誘導体〔I〕の一段工程合成法は、以下のように示される。



ホスホリパ-エ-D-P → リン脂質誘導体 [1] + コリン

このようにして得られたリン脂質誘導体は、リン脂質のリン酸基において用いたシチジンまたはアデノシンの5'位の一級水酸基に基づいて結合したものであつて、このリン脂質誘導体はナトリウ

記のグリセロリン脂質とシチジンまたはアデノシンを、金属イオンの存在下、一級水酸基に対して特異的にリン脂質転移反応を触媒するホスホリパーゼDを用いて溶媒中で反応せしめて得られる。用いるホスホリパーゼDとしては、例えばストレプトミセス属に属するストレプトミセス・エスピー・AA586 (Streptomyces sp AA586 : FERM P-6100) 由来のホスホリパーゼD-P (特開昭58-152481号公報、東洋醸造社製カタログ番号P-39) が好ましい。またその使用量は、ホスファチジルコリン1呼当りホスホリパーゼD 0.01単位以上、好ましくは0.1~100単位である。さらに用いられる溶媒としては、例えばエーテル、ベンゼンまたはクロロホルムなどの有機溶媒とpH 4~9の緩衝液、好ましくは100 mM 酢酸緩衝液(pH 5.6)の有機溶媒-水層の二層系溶媒やジメチルホルムアミドやジメチルスルホキシドと上記緩衝液との混合溶媒の一層均一系溶媒が挙げられる。さらにまた金属イオン放出源としては、通常塩化カルシウムが用いられ、その他の金属イオン

ム塩などの無毒性塩となすこともできる。

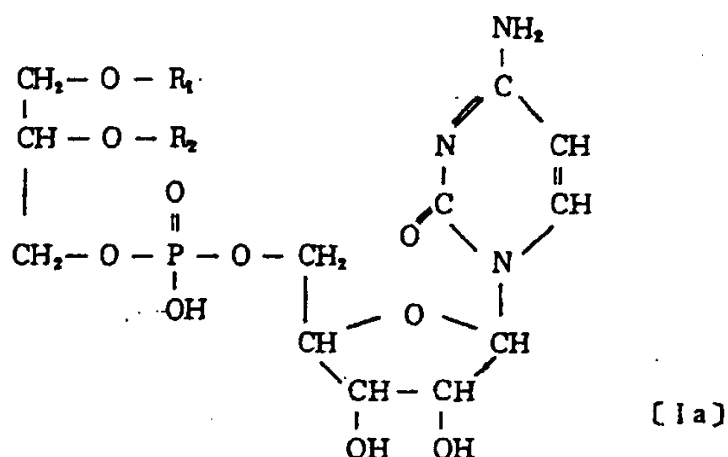
## 实施例

以下に本発明の実施例を挙げて具体的に述べるが、本発明は何らこれらによつて限定されるものではない。

### 实施例 1

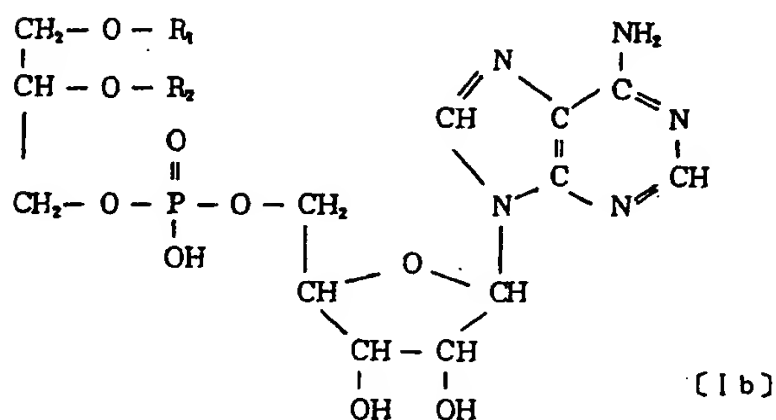
シチジン 10 g を、100 m M 塩化カルシウム含有 100 m M 酢酸緩衝液 (pH 5.6) 20 ml に加え、45℃ 下 20 分間攪拌した。これに、ホスホリバーゼ D-P (ストレプトミセス属由来、東洋醸造社製) 10 mg (比活性: 160 単位/mg) およびジバルミトイルホスファチジルコリン 15 g を 30 ml クロロホルム (Merck 社製: 液体クロマトグラフィー用) 溶液として加え、45℃ にて 3 時間攪拌して反応せしめた。反応後反応液を冷却した。次いで精製、回収のため、この反応液にメタノール 20 ml を加えて分液して有機層を回収し、残った水層にクロロホルム 30 ml およびメタノール 15 ml を加えて分液した。有機層は合せて、水 20 ml、メタノール 20 ml を加えて分液し、ワットマン 1-PS 濾紙にて濾

過した後減圧乾固した。残渣にクロロホルム：エタノール（1：1）混液 30 ml を加えて再び減圧乾固後、残渣を少量のクロロホルムに溶かし、フラッシュカラム（Merck 社製、シリカゲル Art 9385、直径 4 cm × 15 cm）にチャージし、クロロホルムから、クロロホルム：メタノール混液（20：1）、（7：1）、（4：1）、（3：1）、（2：1）の順にて展開溶出した。溶出液を減圧乾固して、下記構造式 [Ia] で示される化合物 1.06 g を得た。



（式中、 $R_1$  および  $R_2$  はいずれもパルミトイル基である）

で示される化合物 1.23 g ( $\lambda_{\max}$  262 nm、Rf 値 0.37) を得た。



（式中、 $R_1$  および  $R_2$  はいずれもラジール基である）

#### 発明の効果

本発明において、グリセリン脂質とシチジンまたはアデノシンとをホスホリパーゼ D - P の存在下に反応させることにより一段工程反応により収率よく新規リン脂質誘導体 [I] を得たもので、この新規リン脂質誘導体 [I] は、ホスホリパーゼ活性測定用基質として利用できるもので、例えばリン脂質誘導体 [I] にホスホリパーゼ C または /

UV 吸収スペクトル  $\lambda_{\max}$  : 273 nm (メタノール：クロロホルム = 20 : 1 中にて測定)、FAB マススペクトル :  $m/e$  874 ( $MH^+$ )、

Rf 値 : 0.26 (クロロホルム：メタノール：水 = 65 : 25 : 3 を展開溶媒とし、Merck 社製 Art 5715 プレートを使用し、スポットは UV ランプおよびモリブデン青試薬により検出した。なお以下、Rf 値の測定は同一条件にて行なつたものである)、  
実施例 2

実施例 1 のジパルミトイルホスファチジルコリンの代りに、ホスファチジルコリン（卵黄レシチン）1.5 g を用い、以下実施例 1 と同様に行なつて、構造式 [Ia] における  $R_1$  および  $R_2$  がラジール基で示される化合物 0.93 g ( $\lambda_{\max}$  273 nm、Rf 値 0.26) を得た。

#### 実施例 3

実施例 1 のジパルミトイルホスファチジルコリンの代りにホスファチジルコリン（卵黄レシチン）2.0 g、シチジンの代りにアデノシン 3.0 g を用い、以下実施例 1 と同様に行なつて、下記構造式 [Ib]

およびホスホリパーゼ D を含有する被検液を 37℃ で作用せしめ、次いで遊離するヌクレオチドまたは / およびヌクレオシドを公知方法に基づいて測定することによりホスホリパーゼ C またはホスホリパーゼの活性測定、または両酵素活性の同時活性測定が簡便になし得るものであり、さらに抗腫瘍剤などの医薬原料として期待されるものである。

特許出願人 東洋醸造株式会社

手 続 補 正 書

昭和61年3月11日

特許庁長官 宇 賀 道 郎 殿

1. 事件の表示

昭和60年特許願第81786号

2. 発明の名称

新規リン脂質誘導体

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 静岡県田方郡大仁町三福632番地

の1

名称 東 洋 醸 造 株 式 会 社

代表者 高 田 哲 男

4. 補正命令の日付

自 発

5. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

6. 補正の内容

明細書第3頁第11～第12行の

「脱アミノ化等の作用を受けて急速に不活性な物

質に分解されやすいこと」を

「脱アミノ化等による不活性化」と訂正する。

明細書第5頁第9行の

「水酸」を

「水酸基」と訂正する。

明細書第8頁第2行の

「金属イオンの存在下、」を

「（金属イオンの存在下、）」と訂正する。

明細書同頁第14行の

「pH4」を

「pH3」と訂正する。

明細書第9頁第3行の

「30～50℃」を

「20～60℃」と訂正する。